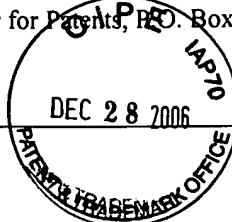


12-29-06

1 fu

Date: December 28, 2006 Label No. EV908959226US I hereby certify that, on the date indicated above, I deposited this paper with identified attachments and/or fee with the U.S. Postal Service and that it was addressed for delivery to the Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 by "Express Mail Post Office to Addressee" service.

Kim Blum
Name (Print)



Kim Blum
Signature

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:	Kyoji OGOSHI)	Examiner:	Suzanne Marie Noakes
)		
Application No.:	10/681,352)	Group Art Unit:	1656
)		
Filed:	October 8, 2003)	Confirmation No.:	8311
)		
Docket No.:	3190-044)	Customer No.:	33432

For: DIAGNOSTIC METHOD OF SELECTING APPROPRIATE CANCER TREATMENTS AND
SCREENING METHOD OF MEASURING REAGENTS AND CURATIVE MEDICINES
FOR CANCER PATIENTS

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

December 28, 2006

Sir:

The benefit of the filing date of April 10, 2001 and September 4, 2001 of the following prior Japanese Patent Applications are hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

Japanese Patent Application No. 2001-111856 filed April 10, 2001, and

Japanese Patent Application No. 2001-267524 filed September 4, 2001

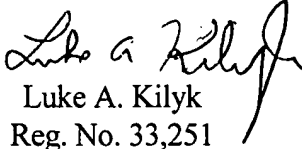
In support of this claim, the requisite certified copy of said original Japanese Patent Application Nos. 2001-111856 and 2001-267524 are filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge such fees to our Deposit Account No. 50-0925.

U.S. Patent Application No. 10/681,352
Submission of Priority Documents

Respectfully submitted,


Luke A. Kilyk
Reg. No. 33,251

Atty. Docket No. 3190-044
KILYK & BOWERSOX, P.L.L.C.
400 Holiday Court, Suite 102
Warrenton, VA 20186
Tel: (540) 428-1701
Fax: (540) 428-1720
Encl.: Certified Copy of Priority Documents

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 4 月 1 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 1 1 1 8 5 6
Application Number:

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

country code and number
of our priority application,
as used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 1 - 1 1 1 8 5 6

願 人 生 越 喬 二
Applicant(s):

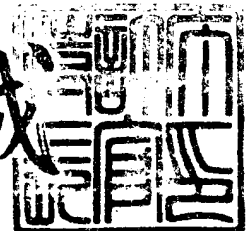
CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 6 年 1 2 月 1 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

中 嶋

誠



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP01-1033

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G06F 19/00

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市上鶴間 4 0 8 - 2 6

 【氏名】 生越喬二

【特許出願人】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市上鶴間 4 0 8 - 2 6

 【氏名又は名称】 生越喬二

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

 【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 067070

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子検定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下のHLA遺伝子におけるコードするアミノ酸をマーカーとする遺伝子検定方法。

1) HLAクラスIIのDQB1遺伝子のアミノ酸配列の 5 7 位及び／又は 6 7 位

2) HLAクラスIIのDRB1遺伝子のアミノ酸配列の 5 7 位及び／又は 6 7 位

【請求項 2】 DRB1遺伝子のアミノ酸配列の 5 7 位がAspかその他かを検定する請求項 1 の方法。

【請求項 3】 DRB1遺伝子のアミノ酸配列の 6 7 位がIle、Phe、Leuかその他かを検定する請求項 1 の方法。

【請求項 4】 Aspである対象者を癌化学療法が有効でなくBRM等の癌免疫学的治療が有効であると判定される請求項 2 の方法。

【請求項 5】 Ileである対象者をBRM等の癌免疫学的治療が有効でなく、癌化学療法が有効であると判定される請求項 3 の方法。

【請求項 6】 DQB1遺伝子のアミノ酸配列の 5 7 位が、Aspかその他かを検定する請求項 1 の方法。

【請求項 7】 DQB1遺伝子のアミノ酸配列の 6 7 位が、Valかその他かを検定する請求項 1 の方法。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 5 のマーカーによって選別される医薬品開発における治験者の選別方法。

【請求項 9】 請求項 1 ～ 5 のマーカーによって適応症が特定される制癌剤。

【請求項 1 0】 請求項 1 ～ 5 のマーカーを測定する癌の治療手段の選別方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】

本発明は、HLA遺伝子の特定領域の特定部位のアミノ酸をマーカーとする遺伝

子検定手段に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

一つの遺伝子座によって支配される遺伝子形質に複数の表現型が存在し、これが集団内で遺伝子的平衡を保っている場合に、その形質には多型性があるといわれ、各々の型を対立形質という。多型性は表現形質、即ち、蛋白質を構成するアミノ酸配列の違いに起因しているのみならず、アミノ酸配列の変化を伴わないDNA塩基配列のレベルでも存在し、多くの場合、制限酵素によるDNA切断部位の違いとして検出される。

【0003】

人MHC（主用組織適合性複合体）分子であるHLA分子は、1952年に輸血患者血清中に白血球凝集試験で反応する抗体を見出し、これに対する抗原として発見された。HLA分子は、第6染色体短腕部の6p21.3の約4000kbp内に存在するMHC領域によりコードされた遺伝子群に支配される遺伝子産物である。このMHC領域は、殆どの真核細胞膜表面上に表現されるHLA-A、B、C、抗原系を支配するクラスI遺伝子領域と、B細胞やマクロファージ等の限定された組織あるいは細胞にしか表現されていない細胞特異的なHLA-DP、DQ、DR抗原系を支配するクラスII遺伝子領域、及び補体成分と21-ヒドロキシラーゼなどを支配するクラスIII遺伝子領域より構成されている。

【0004】

クラスII分子は、34kDaの糖蛋白（ α 鎖）と29kDaの糖蛋白（ β 鎖）が非共有結合した細胞膜抗原である。この α 鎖遺伝子は7個、 β 鎖遺伝子が9～12個（16種）というようにクラスターを形成し、多重遺伝子族を構成する。クラスII遺伝子領域には、セントロメア側からDP-DN-DM-DO-DQ-DRの順に各遺伝子が位置する。HLA-DP、DQ、DR抗原は多数のアロ抗原タイプからなり、その多型性は主に β 鎖（B1）のアミノ酸配列の違いによって決定される。なお、DR、DQ抗原はB細胞によって産生される抗体によって認識されるエピトープである。

【0005】

HLA分子はいずれも90個程度のアミノ酸がひとかたまりになったドメイン構造によって構成される。クラスII分子は、 $\alpha 1$ ($\beta 1$)、 $\alpha 2$ ($\beta 2$) ドメイン、結合ペプチド (CP)、TM、CY領域からなり、 $\alpha 1$ ドメインと $\beta 1$ ドメインが多型性部位を構成し、 $\alpha 2$ ドメインと $\beta 2$ ドメインがクラスII分子の基底部を形作っている。

【0006】

HLA分子の遺伝的多型性は、対応する各HLA遺伝子によってコードされるアミノ酸配列の違いによって形成される。これは各遺伝子DNAの塩基配列の差の反映であり、これまでに殆ど全てのアロ抗原タイプの塩基配列が決定されている (Tissue Antigens, 45, 258-280, 1995)。多型性を示す領域は、クラスI分子では $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ドメインに集中し、 $\alpha 1$ ドメインC端側・ $\alpha 2$ ドメインN端側に各1個の共通する超可変部が存在する。クラスII分子では、超可変部がDQ α 鎖の $\alpha 1$ ドメインとDR β 、DQ β 、DP β 鎖の $\beta 1$ ドメインに存在し、各ドメインの特定3ヶ所の領域に多型性が集中している (Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 84, 6234-6238, 1987)。これら超可変部のアミノ酸残基の置換、あるいはアロ抗原タイプの違いは、抗原ペプチドに対するHLA分子の親和性に直接的な影響を与え、特定のHLA分子と結合できる抗原ペプチドの種類を変化させるのみならず、TCRとの親和性にも影響して、結果として抗原提示能をも変化させる。そして、HLA抗原型の異なる個人間では外来抗原や自己抗原に対する免疫応答能に差が出来ることとなり、免疫応答の個体差が生まれる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が、解決しようとする問題点は、HLA遺伝子における特定領域の特定部位のアミノ酸の変異がもたらす機能を解明し、その医療分野における利用手段を提供しようとするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、HLA遺伝子群のうちDQB遺伝子及びDRB遺伝子に着目し、そのアミノ酸配列の変異と癌患者の治療手段への感応性の関係を統計学的に分析し、

その結果、癌患者には癌化学療法剤への応答型と癌免疫治療剤への応答型が特定アミノ酸配列部位の変異と関係があることを見出し本発明を完成した。

すなわち本発明は、

1. 以下のHLA遺伝子におけるコードするアミノ酸をマーカーとする遺伝子検定方法。

1) HLAクラスIIのDQB1遺伝子のアミノ酸配列の57位及び／又は67位

2) HLAクラスIIのDRB1遺伝子のアミノ酸配列の57位及び／又は67位

2. DRB1遺伝子のアミノ酸配列の57位がAspかその他かを検定する前項1の方法。

3. DRB1遺伝子のアミノ酸配列の67位がIle、Phe、Leuかその他かを検定する前項1の方法。

4. Aspである対象者をBRM等の癌化学療法が有効でなく癌免疫学的治療が有効であると判定される前項2の方法。

5. Ileである対象者をBRM等の癌免疫学的治療が有効でなく、癌化学療法が有効であると判定される前項3の方法。

6. DQB1遺伝子のアミノ酸配列の57位が、Aspかその他かを検定する前項1の方法。

7. DQB1遺伝子のアミノ酸配列の67位が、Valかその他かを検定する前項1の方法。

8. 前項1～5のマーカーによって選別される医薬品開発における治験者の選別方法。

9. 前項1～5のマーカーによって適応症が特定される制癌剤。

10. 前項1～5のマーカーを測定する癌の治療手段の選別方法。
からなる。

【0009】

【発明の実施の形態】

【0010】

【実施例】

【臨床例】

本発明の実験手法は以下によった。

- 1) 遺伝子多型の確認は公知の文献に基づき行った。(WHO HLA Nomenclature Committee For Factors of the HLA system, IMGT/HLA Sequence Database, <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>, Tissue Antigens, 1998;51:417-466)
- 2) 患者は、約 10 年にわたり癌細胞の切除のみを行った群、癌切除後に化学療法 (5-FU などのフッ化ピリミジン剤又はマイトマイシン、アドリアマイシンなどの治療) を施した群、癌切除後に癌免疫療法 (PSK 又は OK432 治療) を施した群の各群約それぞれ、344, 394, 241 名である。
- 3) 患者からの遺伝子の採取及びその確認は常法により行った (MHC & IRS, Supplement Vol. 1 73-95, 1994. Tissue Antigens 39:187-202, 1992. 38;53-59, 1991, 38;60-71, 1991, 40;100-103, 1992)

【0 0 1 1】

【臨床試験結果】

図 1 は、DQB 遺伝子群の塩基配列と該当するアミノ酸を示し、アミノ酸配列の 57 位と 67 位の多型性を分析した。その結果、57 位には、Asp Ala Ser Val が確認され、67 位には Ile Val が確認された。

【0 0 1 2】

図 2 及び図 3 は、DRB 遺伝子群との塩基配列と該当するアミノ酸を示し、アミノ酸配列の 57 位と 67 位の多型性を分析した。その結果、57 位には、Asp Ala Ser Val が確認され、67 位には Ile Leu Phe が確認された。

【0 0 1 3】

図 4 は、DQB 遺伝子群の患者のうち DQRB1*05031 遺伝子を持つ患者 b 群 (57 位: Asp、67 位: Val) と DQRB1*05031 遺伝子を持たない患者群 a の胃癌切除のみを行った場合の結果である。縦軸が累積生存率 (Kaplan-Meier Method) (1.0 は 100% の生存率)、横軸が生存日数を示す。その結果、判断の基準となる 1825 日目 (5 年目) では若干の + (b) 患者 (DQRB1*05031 遺伝子を持つ患者) に生存に優位性を確認できるがそれほど明確ではない。しかし、7 年目、8 年目では、+ (b) 患者のほうが生存率が高

いことが確認できる。この結果、D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子（5 7 位：Asp、6 7 位：Valを保有する）を保有する者は、胃切除後の生存において若干の優位性を示唆する者と解せる。（DQB1*05031(-) (n=306), (+) (n=38))

【0 0 1 4】

図 5 は、D Q B 遺伝子群の患者のうち D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子を持つ患者群 b（5 7 位：Asp、6 7 位：Val）と D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子を持たない患者群 a に胃癌切除後に癌化学療法を施した場合の累積生存率を示す。癌化学療法とは、5-FU、アドリマイシン等の臨床で汎用されている制癌化学物質を各治療処方に順じて治療されている。この図から明らかなことは、本遺伝子的特徴をもつ患者（+）と持たない患者（-）で生存率が完全に逆転していることである。つまり + (b) の患者には癌化学療法は不適であるということを示す。その結果、遺伝子分析において、D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子（5 7 位：Asp、6 7 位：Val）を保持することが事前に確認されればこの患者には癌化学療法は避けることが処方されるのである。一方、D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子を持たない - (a) の患者（5 7 位：Asp、6 7 位：Val 以外）には、癌化学療法が有効であると処方できるのである。さらに、癌化学療法剤の有効性試験をこの遺伝子多型の - の者を選別すればその有効率は大きく変化するのである。（DQB1*05031(-) (n=356), (+) (n=38))

【0 0 1 5】

図 6 は、D Q B 遺伝子群の患者のうち D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子を持つ患者群 b（5 7 位：Asp、6 7 位：Val）と D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子を持たない患者群 a に胃癌切除後に癌免疫療法を施した場合の累積生存率を示す。癌免疫療法とは、クレスチン（PSK）、OK 4 3 2 等の臨床で汎用されている制癌免疫物質を各治療処方に順じて治療されている。この図から明らかなことは、本遺伝子的特徴をもつ患者（+）（b）と持たない患者（-）（a）では、持つ患者（+）の生存率が完全に優位なことである。+ 患者では 5 年目において、約 9 0 % の患者の生存が確認でき、- 患者では約 5 0 % 程度に落ち込んでいるのである。その結果、遺伝子分析において、D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子（5 7 位：Asp、6 7 位：Val）を保持することが事前に確認されればこの患者には癌免疫療

法は積極的に処方されるのである。一方、D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子を持たない患者（5 7 位：Asp、6 7 位：Val以外）には、癌免疫療法が有効でないと判断できるのである。癌免疫療法剤の有効性試験をこの遺伝子多型の+の者を選別すればあるいは-の者を排除すればその有効率は大きく変化するのである。（DQ B1*05031(-) (n=223), (+) (n=18))

【0 0 1 6】

図7は、D R B 遺伝子群の患者のうちD R B 1 の5 7 位：Aspの患者群 b (+)、そうでない患者群 a (-) の胃切除のみを行った場合の累積生存率を示す。約8年目において、一患者の生存率が若干有利であり、この遺伝子型をもたない者の生存的優位性を確認できる。

【0 0 1 7】

図8は、D R B 遺伝子群の患者のうちD R B 1 の5 7 位：Aspの患者群 b (+)、そうでない患者群 a (-) の胃切除後に癌化学療法を行った場合の累積生存率を示す。この結果は、+-と癌化学療法には関係は無いことを示す。

【0 0 1 8】

図9は、D R B 遺伝子群の患者のうちD R B 1 の5 7 位：Aspの患者群 b (+)、そうでない患者群 a (-) の胃切除後に癌免疫療法を行った場合の累積生存率を示す。この結果は、+の患者と癌免疫療法には有意の関係が存在することを示す。癌免疫療法を行う場合は、5 7 位がAspの患者を選択することは効果が著しく上昇することを示唆する。

【0 0 1 9】

図10は、D R B 遺伝子群の患者のうちD R B 1 の6 7 位：Ileの患者群 b (+)、そうでない患者群 a (-) の胃切除のみを行った場合の累積生存率を示す。この結果は、+-の患者には有意の差異が存在しないことを示す。

【0 0 2 0】

図11は、D R B 遺伝子群の患者のうちD R B 1 の6 7 位：Ileの患者群 b (+)、そうでない患者群 a (-) の胃切除後に癌化学療法を行った場合の累積生存率を示す。この結果は、+の患者は癌化学療法を施すことが有効であることを示す。すなわち、本部位にIleを保持する患者を選別して癌化学療法を施せばそ

の治療効果はより期待できることを意味する。

【0021】

図12は、DRB遺伝子群の患者のうちDRB1の67位：Ileの患者群b（+）、そうでない患者群a（-）の胃切除後に癌免疫療法を行った場合の累積生存率を示す。この結果は、-の患者は癌免疫療法を施すことが有効であることを示す。すなわち、本部位にIleを保持しない患者を選別して癌免疫療法を施せばその治療効果はより期待できることを意味する。

【0022】

図13は、DRB遺伝子群の患者のうちDRB1の67位がIleの患者群c：DR67I（+）、そうでない患者群d：DR67I（-）、67位がIle及びPheの患者群b：DR67I（+）／F（+）、67位がIle及びLeuの患者群a：DR67I（+）／L（+）の胃切除のみを行った場合の累積生存率を示す。

【0023】

図14は、DRB遺伝子群の患者のうちDRB1の67位がIleの患者群c：DR67I（+）、そうでない患者群d：DR67I（-）、67位がIle及びPheの患者群b：DR67I（+）／F（+）、67位がIle及びLeuの患者群a：DR67I（+）／L（+）の胃切除後癌化学療法を行った場合の累積生存率を示す。この結果は、DR67I（+）／F（+）とDR67I（+）の患者、すなわち、本部位にIleを保持する患者は癌学療法を施すと有効であることを示す、しかし、その中で、Leuも持っている患者では効果を示さない。

【0024】

図15は、DRB遺伝子群の患者のうちDRB1の67位がIleの患者群c：DR67I（+）、そうでない患者群d：DR67I（-）、67位がIle及びPheの患者群b：DR67I（+）／F（+）、67位がIle及びLeuの患者群a：DR67I（+）／L（+）の胃切除後癌免疫療法を行った場合の累積生存率を示す。この結果、aタイプの患者群は、癌免疫療法に向いていないことが判明し、67位にLeuが存在すれば免疫療法でも患者は大きな障害をうけることが推定される。免疫療法のための薬剤の有効性評価には67位にLeuが存在する者は避けるべきである。いずれにしても、DR67I（-）とDR67I（+）が同一

曲線を示しているので、DRB1の67位がIleの患者群は化学療法の適応であると考えられる。

【0025】

図16は、DRB遺伝子群の患者のうちDRB1の57位がAsp、67位がIleの胃切除のみを行った場合の累積生存率を示す。患者群aは57位Aspで67位がIle、bは57位Aspで67位がIle以外、cは57位Asp以外で67位がIle、dは57位Asp以外で67位もIle以外を示す。

【0026】

図17は、DRB遺伝子群の患者のうちDRB1の57位がAsp、67位がIleの患者群：a、57位Aspで67位がIle以外の患者群：b、57位Asp以外で67位がIleの患者群：c、57位Asp以外で67位もIle以外の患者群：dの胃切除後癌化学療法を行った場合の累積生存率を示す。

この結果、癌化学療法には67位のIleが存在することが重要であり、これが存在しない患者には癌化学療法は不適であることが確認された。薬剤の癌化学療法のための薬剤の有効性評価には67位にIleが存在する者を選び、存在しない者は避けるべきである。

【0027】

図18は、DRB遺伝子群の患者のうちDRB1の57位がAsp、67位がIleの胃切除後癌免疫療法を行った場合の累積生存率を示す。図中aは57位Aspで67位がIle、bは57位Aspで67位がIle以外、cは57位Asp以外で67位がIle、dは57位Asp以外で67位もIle以外を示す。この結果、癌免疫療法には67位のIleが存在しないこと、57位がAspであることが重要であることが確認された。癌免疫療法のための薬剤の有効性評価には67位にIleが存在し、57位にはAspのないものを選ぶことは避けるべきである。

【0028】

以上の分析により、DRB1遺伝子、DRQB1遺伝子ともに、57位及び67位のアミノ酸の種類が極めて重要で、この部位におけるアミノ酸の変異を検出すれば、腫瘍切除後の治療方針、処方されるべき薬剤の選定が極めてその高い効果を予測して履行可能となった。また、この遺伝子部位における変異をマーカー

に制癌剤の適用症を選定すれば極めて効率的かつ確実に制癌剤に治療効果を増大させうることを見出した。

【0029】

【実験例】

P H A 刺激試験（胃がん症例のリンパ球活性化反応）を常法に順じて行った。結果は、図 1 9、2 0 に示した。Stimulation Index は以下のように求めた。ヘパリン化末梢血を Ficoll-Conray 比重遠心法で処理し、リンパ球を分離した。これに R P M I - 1 6 4 0 を加え $6.0 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整した。これを $0.1 \text{ ml} / \text{Well}$ で 9 6 穴 U 底マイクロプレート（コーニング # 2 8 5 0）に分注し、各刺激試験を行う。I 群は、P S K ($1 \text{ mg} / \text{ml}$ $0.1 \text{ ml} / \text{Well}$) 添加群、II 群は O K - 4 3 2 ($1 / 200 \text{ KE} / \text{ml}$ $0.1 \text{ ml} / \text{Well}$) 添加群、III 群は培地 ($0.1 \text{ ml} / \text{well}$) 添加群とした。I 群は、さらに 3 種の処理に分け I-1 群（図 1 9、2 0 中 P S K と表示）（5 日間 incubation）、I-2 群（図中同 P S K と表示）（3 日間 incubation 後 P S K を $0.1 \text{ mg} / \text{Well}$ 添加しその後 2 日間 incubation した）、I-3 群（図中異 P S K と表示）（3 日間 incubation 後 O K 4 3 2 を $0.005 \text{ KE} / \text{Well}$ 添加しその後 2 日間 incubation した）とした。II 群も同様の処理をし、II-1 群（図中同 M i x と表示）、II-2 群（図中異 O K と表示）、II-3 群（図中同 O K と表示）とした。なおこの群には O K 4 3 2 を倍量添加した II-4 群（図中同 Mix2 と表示）も加えた。III 群は 5 日間 incubation した。

これら調製された反応液に ^3H -thymidine の $1 \mu\text{Ci} / \text{Well}$ を添加し、各 2 4 時間 incubation し、培養リンパ球を harvest scintillation counter によって測定した。

【0030】

図 1 9 は、D R B 1 遺伝子の 6 7 位が、Ile、Leu、Phe の場合の P H A 刺激性試験の結果を示す。これにより免疫応答への活性化度をみるものである。表は縦軸に S I 横軸に各種刺激方法、各群は左より a 群〔6 7 位 Ile (+) 及び Leu (+)〕、b 群〔6 7 位 Ile (+) 及び Phe (+)〕、c 群〔6 7 位 Ile (+)〕、d 群〔6 7 位 Ile (-)〕、e 群〔6 7 位 Ile、Leu、Phe 以外〕を示す。結果は、図 2 0 から、刺激は 2 回することが十分な免疫活性をあげるために必要であり、そ

の反応性は67位のアミノ酸の種類に依存することを示した。67位にIleが存在することは重要であるが、同時にLeuやPheが存在しても反応性の悪いことを示した。このことと、図14で示した67位にIleが存在する場合の癌化学療法剤に特徴的な効果は、免疫能が活発な患者には癌化学療法剤が有効であることを証明する。

【0031】

図20は、DQB1遺伝子の57位がAsp、67位がValの有無による同様の試験である。表は縦軸にSI横軸に各種刺激方法、各群は左よりa群及びb群を示す。この結果、同様の免疫応答を示し、57位がAspと67位がValでない群（a群）が57位がAspと67位がValの群（b群）より免疫活性が高いことを示した。このことと、図6に示した57位がAspと67位がValの群が癌免疫療法に有効であった結果とを比較すると、免疫能が活発な患者には癌免疫療法は有効でないことを証明するものである。

【発明の効果】

本発明ではDRB1遺伝子、DQB1遺伝子について、その多型における特定部位のアミノ酸の変異と癌治療における効果及び免疫能との関係を明かにしたから、この遺伝子部位における変異をマーカーにすれば癌治療における極めて有用な手段を提供し、さらに医薬品開発における有効性評価に極めて効率化を達成するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 DQB遺伝子群の塩基配列と該当するアミノ酸

【図2】 DRB遺伝子群との塩基配列と該当するアミノ酸

【図3】 DRB遺伝子群との塩基配列と該当するアミノ酸

【図4】 DQRB1*05031遺伝子を持つ患者群（57位：Asp、67位：Val）とDQRB1*05031遺伝子を持たない患者群の胃癌切除のみを行った場合の結果。

【図5】 DQRB1*05031遺伝子を持つ患者群（57位：Asp、67位：Val）とDQRB1*05031遺伝子を持たない患者群に胃癌切除後に癌化学療法を施した場合の結果。

【図 6】 D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子を持つ患者群（5 7 位：Asp、6 7 位：Val）と D Q R B 1 * 0 5 0 3 1 遺伝子を持たない患者群に胃癌切除後に癌免疫療法を施した場合の結果。

【図 7】 D R B 遺伝子群の患者のうち D R B 1 の 5 7 位：Asp の患者群（＋）、そうでない患者群（－）の胃切除のみを行った場合の結果。

【図 8】 D R B 遺伝子群の患者のうち D R B 1 の 5 7 位：Asp の患者群（＋）、そうでない患者（－）の胃切除後に癌化学療法を行った場合の結果。

【図 9】 D R B 遺伝子群の患者のうち D R B 1 の 5 7 位：Asp の患者群（＋）、そうでない患者群（－）の胃切除後に癌免疫療法を行った場合の結果。

【図 10】 D R B 遺伝子群の患者のうち D R B 1 の 6 7 位：Ile の患者群（＋）、そうでない患者群（－）の胃切除のみを行った場合の結果。

【図 11】 D R B 遺伝子群の患者のうち D R B 1 の 6 7 位：Ile の患者群（＋）、そうでない患者群（－）の胃切除後に癌化学療法を行った場合の結果。

【図 12】 D R B 遺伝子群の患者のうち D R B 1 の 6 7 位：Ile の患者群（＋）、そうでない患者群（－）の胃切除後に癌免疫療法を行った場合の結果。

【図 13】 D R B 遺伝子群の患者のうち D R B 1 の 6 7 位が Ile の患者群 D R 6 7 I （＋）、そうでない患者群 D R 6 7 I （－）、Ile 及び Phe の患者群 D R 6 7 I （＋）／F （＋）、Ile 及び Leu 患者群 D R 6 7 I （＋）／L （＋）の胃切除のみの場合の結果。

【図 14】 D R B 1 の 6 7 位が Ile の患者群 D R 6 7 I （＋）、そうでない患者群 D R 6 7 I （－）、Ile 及び Phe の患者群 D R 6 7 I （＋）／F （＋）、Ile 及び Leu 患者群 D R 6 7 I （＋）／L （＋）の胃切除後癌化学療法を行った場合の結果。

【図 15】 D R B 1 の 6 7 位が Ile の患者群 D R 6 7 I （＋）、そうでない患者群 D R 6 7 I （－）、Ile 及び Phe の患者群 D R 6 7 I （＋）／F （＋）、Ile 及び Leu 患者群 D R 6 7 I （＋）／L （＋）の胃切除後癌免疫療法を行った場合の結果。

【図 16】 D R B 1 の 5 7 位が Asp、6 7 位が Ile の胃切除のみを行った場合の結果。

【図 17】 DRB1 の 57 位が Asp、67 位が Ile の胃切除後癌化学療法を行った場合の結果。

【図 18】 DRB1 の 57 位が Asp、67 位が Ile の胃切除後癌免疫療法を行った場合の結果。

【図 19】 DRB1 遺伝子の 67 位が、Ile、Leu、Phe の場合の PHA 刺激性試験の結果。

【図 20】 DQB1 遺伝子の 57 位が Asp、67 位が Val の有無による PHA 刺激性試験の結果。

【符号の説明】

図 1

A、D、V、S、I：アミノ酸の一文字コードを示す。

図 2

D、S、V、F、I、L、A：アミノ酸の一文字コードを示す。

図 3

D、S、V、F、I、L、A：アミノ酸の一文字コードを示す。

図 4

a：DQRB1*05031 遺伝子を持たない患者群

b：DQRB1*05031 遺伝子を持つ患者群（57 位：Asp、67 位：Val）

図 5

a：DQRB1*05031 遺伝子を持たない患者群

b：DQRB1*05031 遺伝子を持つ患者群（57 位：Asp、67 位：Val）

図 6

a：DQRB1*05031 遺伝子を持たない患者群

b：DQRB1*05031 遺伝子を持つ患者群（57 位：Asp、67 位：Val）

図 7

a：DRB1 の 57 位：Asp でない患者群（－）

b：DRB1 の 57 位：Asp の患者群（＋）

図 8

a：DRB1 の 57 位：Asp でない患者群（－）

b : D R B 1 の 5 7 位 : Asp の患者群 (+)

図 9

a : D R B 1 の 5 7 位 : Asp でない患者群 (-)

b : D R B 1 の 5 7 位 : Asp の患者群 (+)

図 1 0

a : D R B 1 の 6 7 位 : Ile でない患者群 (-)

b : D R B 1 の 6 7 位 : Ile の患者群 (+)

図 1 1

a : D R B 1 の 6 7 位 : Ile でない患者群 (-)

b : D R B 1 の 6 7 位 : Ile の患者群 (+)

図 1 2

a : D R B 1 の 6 7 位 : Ile でない患者群 (-)

b : D R B 1 の 6 7 位 : Ile の患者群 (+)

図 1 3

a : D R B 1 の 6 7 位が Ile 及び Leu の患者群 D R 6 7 I (+) / L (+)

b : D R B 1 の 6 7 位が Ile 及び Phe の患者群 D R 6 7 I (+) / F (+)

c : D R B 1 の 6 7 位が Ile の患者群 D R 6 7 I (+)

d : D R B 1 の 6 7 位が Ile でない患者群 D R 6 7 I (-)

図 1 4

a : D R B 1 の 6 7 位が Ile 及び Leu の患者群 D R 6 7 I (+) / L (+)

b : D R B 1 の 6 7 位が Ile 及び Phe の患者群 D R 6 7 I (+) / F (+)

c : D R B 1 の 6 7 位が Ile の患者 D R 6 7 I (+)

d : D R B 1 の 6 7 位が Ile でない患者 D R 6 7 I (-)

図 1 5

a : D R B 1 の 6 7 位が Ile 及び Leu の患者 D R 6 7 I (+) / L (+)

b : D R B 1 の 6 7 位が Ile 及び Phe の患者 D R 6 7 I (+) / F (+)

c : D R B 1 の 6 7 位が Ile の患者 D R 6 7 I (+)

d : D R B 1 の 6 7 位が Ile でない患者 D R 6 7 I (-)

図 1 6

- a : DRB1 の 57 位が Asp、67 位が Ile の患者
- b : DRB1 の 57 位が Asp、67 位が Ile でない患者
- c : DRB1 の 57 位が Asp でなく、67 位が Ile の患者
- d : DRB1 の 57 位が Asp でなく、67 位も Ile でない患者

図 17

- a : DRB1 の 57 位が Asp、67 位が Ile の患者
- b : DRB1 の 57 位が Asp、67 位が Ile でない患者
- c : DRB1 の 57 位が Asp でなく、67 位が Ile の患者
- d : DRB1 の 57 位が Asp でなく、67 位も Ile でない患者

図 18

- a : DRB1 の 57 位が Asp、67 位が Ile の患者
- b : DRB1 の 57 位が Asp、67 位が Ile でない患者
- c : DRB1 の 57 位が Asp でなく、67 位が Ile の患者
- d : DRB1 の 57 位が Asp でなく、67 位も Ile でない患者

図 19

- a : DRB1 の 67 位が Ile 及び Leu の患者
- b : DRB1 の 67 位が Ile 及び Phe の患者
- c : DRB1 の 67 位が Ile の患者
- d : DRB1 の 67 位が Ile でない患者

PSK : I - 1 群

異OK : II - 2 群

異PSK : I - 3 群

同Mix : II - 1 群

同Mix2 : II - 4 群

同OK : II - 3 群

同PSK : I - 2 群

図 20

- a : DQB1 の 57 位が Asp でなく、67 位が Val でない患者
- b : DQB1 の 57 位が Asp、67 位が Val である患者

PSK：I - 1 群

異OK：I I - 2 群

異PSK：I - 3 群

同Mix：I I - 1 群

同Mix2：I I - 4 群

同OK：I I - 3 群

同PSK：I - 2 群

【書類名】図面

【図 1】

DQ	position57		position67	
	nucleotide	amino acid	nucleotide	amino acid
	DQB1*0201	GCC A	ATC I	
	DQB1*03011	GAC D	GTC V	
	DQB1*03012	GAC D	GTC V	
	DQB1*0302	GCC A	GTC V	
	DQB1*03032	GAC D	GTC V	
	DQB1*03033	GAC D	GTC V	
	DQB1*0401	GAC D	ATC I	
	DQB1*0402	GAC D	ATC I	
	DQB1*0501	GTT V	GTC V	
	DQB1*0502	AGC S	GTC V	
	DQB1*05031	GAC D	GTC V	
	DQB1*05032	GAT D	GTC V	
	DQB1*06011	GAC D	ATC I	
	DQB1*06012	GAC D	ATC I	
	DQB1*06013	GAC D	ATC I	
	DQB1*0602	GAT D	GTC V	
	DQB1*0603	GAT D	GTC V	
	DQB1*06041	GTT V	GTC V	
	DQB1*06042	GTT V	GTC V	
	DQB1*06051	GTT V	GTC V	
	DQB1*06052	GTT V	GTC V	

【図 2】

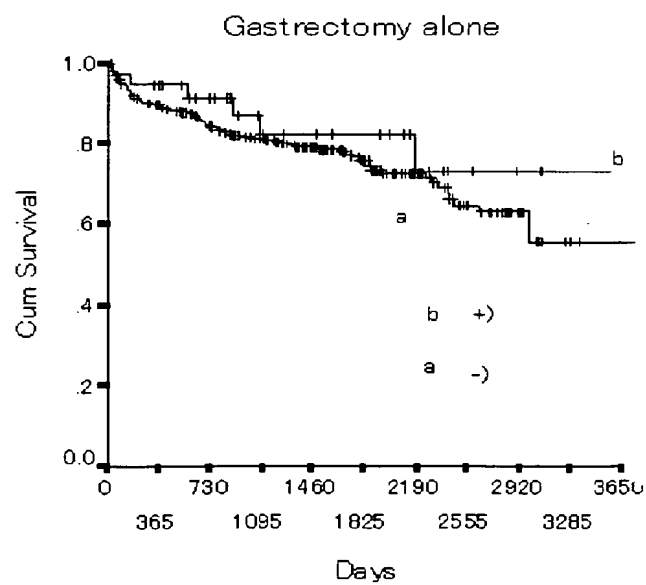
DRB1*0801	AGC	S	TTC	F
DRB1*08021	GAT	D	TTC	F
DRB1*08022	GAT	D	TTC	F
DRB1*0803	AGC	S	ATC	I
DRB1*08041	GAT	D	TTC	F
DRB1*08042	GAT	D	TTC	F
DRB1*08043	GAT	D	TTC	F
DRB1*09012	GTC	V	TTC	F
DRB1*10011	GAT	D	CTC	L
DRB1*10012	GAT	D	CTC	L
DRB1*111011	GAT	D	TTC	F
DRB1*111012	GAT	D	TTC	F
DRB1*111013	GAT	D	TTC	F
DRB1*11102	GAT	D	ATC	I
DRB1*11103	GAT	D	TTC	F
DRB1*111041	GAT	D	TTC	F
DRB1*111042	GAT	D	TTC	F
DRB1*1201	GTC	V	ATC	I
DRB1*12021	GTC	V	TTC	F
DRB1*12022	GTC	V	TTC	F
DRB1*1301	GAT	D	ATC	I
DRB1*13021	GAT	D	ATC	I
DRB1*13022	GAT	D	ATC	I

【図 3】

DRB1*1303	AGC	S	ATC	I
DRB1*1304	AGC	S	ATC	I
DRB1*1305	GAT	D	TTC	F
DRB1*14011	GCT	A	CTC	L
DRB1*14012	GCT	A	CTC	L
DRB1*1402	GAT	D	CTC	L
DRB1*1403	GAT	D	CTC	L
DRB1*1404	GCT	A	CTC	L
DRB1*1405	GAT	D	CTC	L
DRB1*1406	GAT	D	CTC	L
DRB1*1407	GCT	A	CTC	L
DRB1*1408	GAT	D	CTC	L
DRB1*15011	GAC	D	TTC	F
DRB1*15012	GAC	D	TTC	F
DRB1*15021	GAC	D	ATC	I
DRB1*15022	GCC	D	ATC	I
DRB1*15023	GAC	D	ATC	I
DRB1*16011	GAC	D	TTC	F
DRB1*16012	GAC	D	TTC	F
DRB1*16021	GAC	D	CTC	L
DRB1*16022	GAC	D	CTC	L

【図 4】

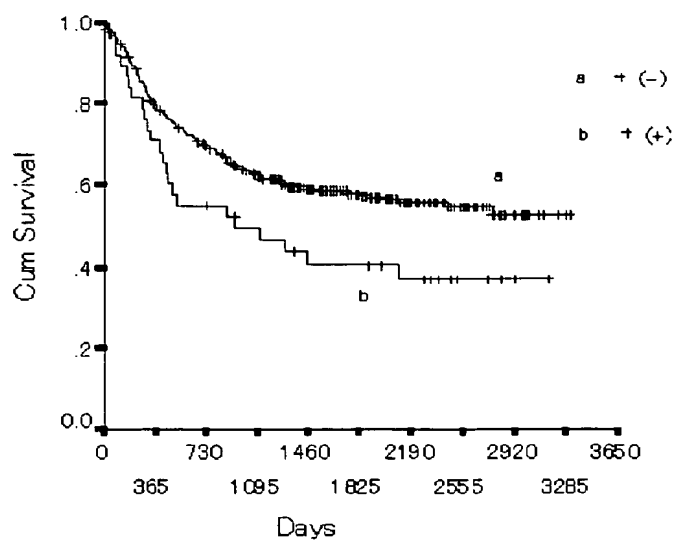
DQB1*050301(1)



【図 5】

DQB1*050301(2)

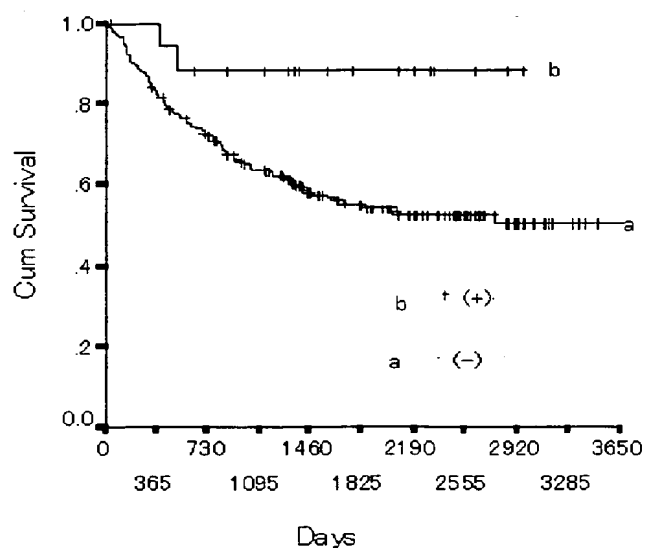
化 学



【図 6】

DQB1*050301(3)

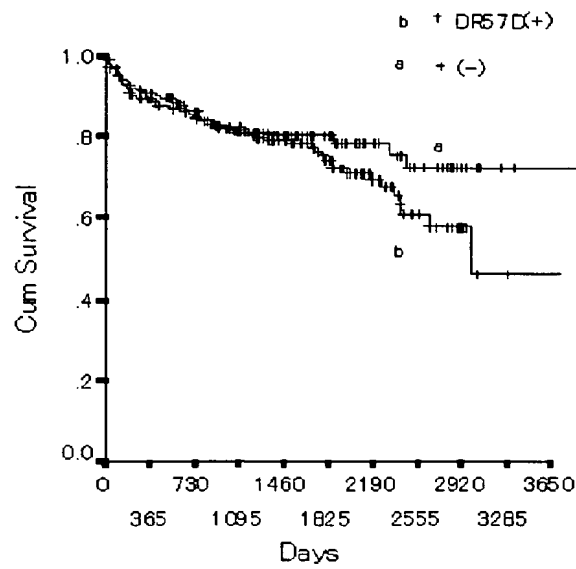
免 疫



【図 7】

DR57D-1

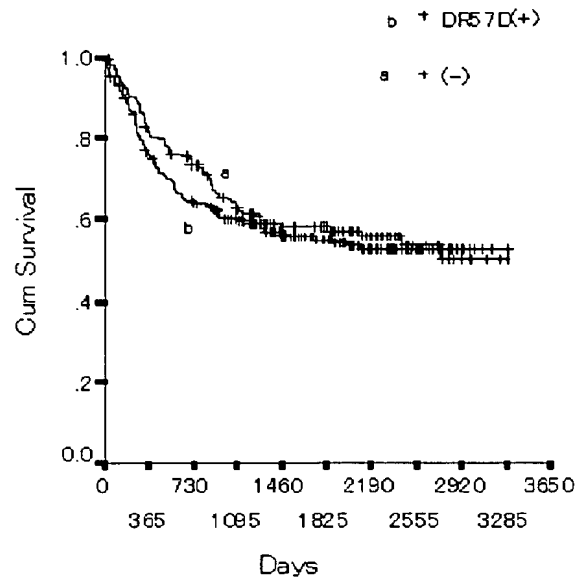
Gastrectomy alone



【図 8】

DR57D-2

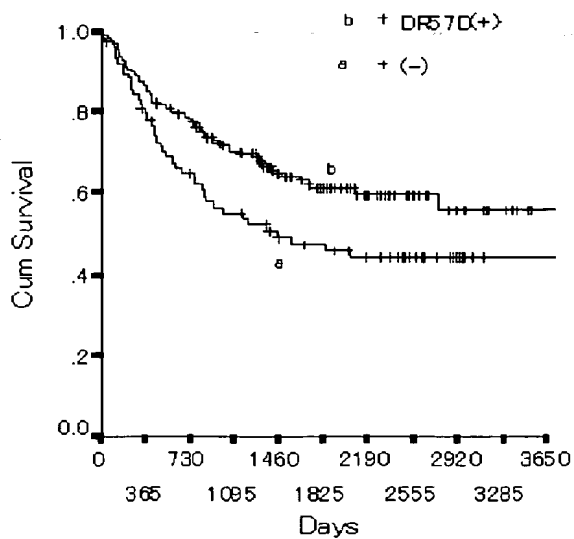
化 学



【図 9】

DR57D-3

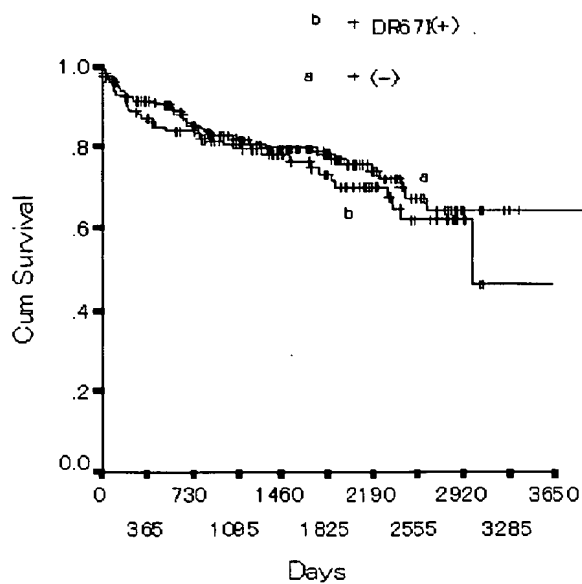
免 疫



【図 10】

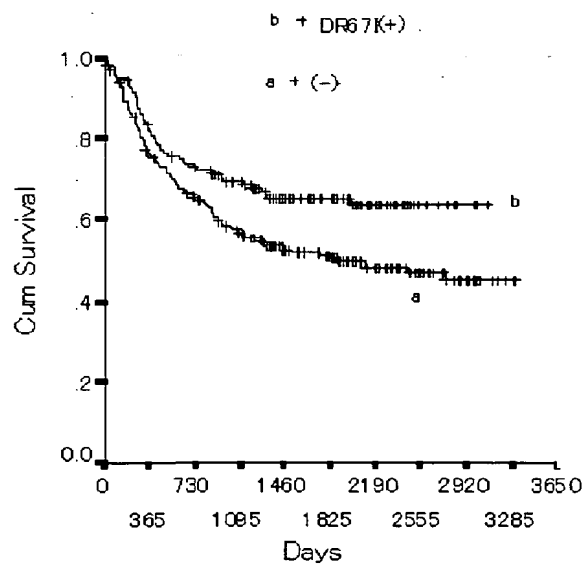
DR67I-1

Gastrectomy alone



【図 11】

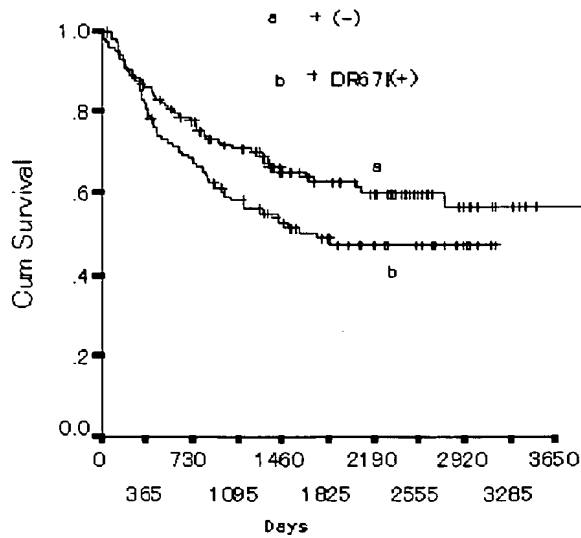
DR67I-2 化学



【図 1 2】

DR67I-3

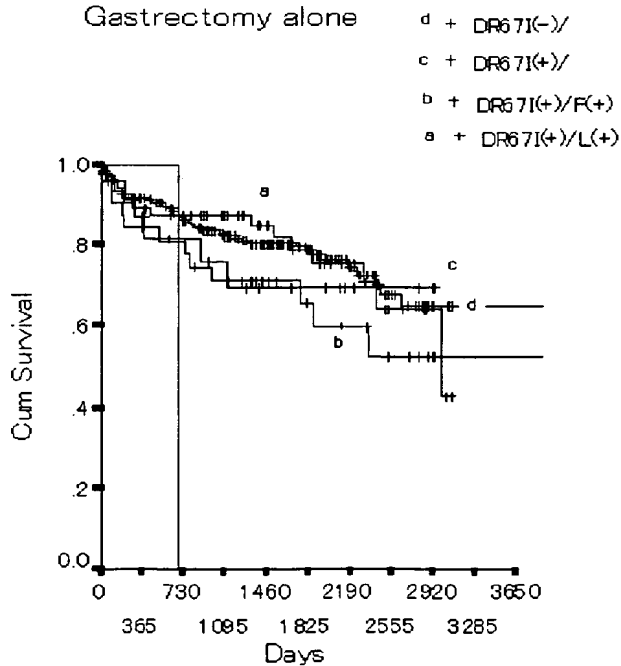
免疫



【図 1 3】

DR67I,F,L-1

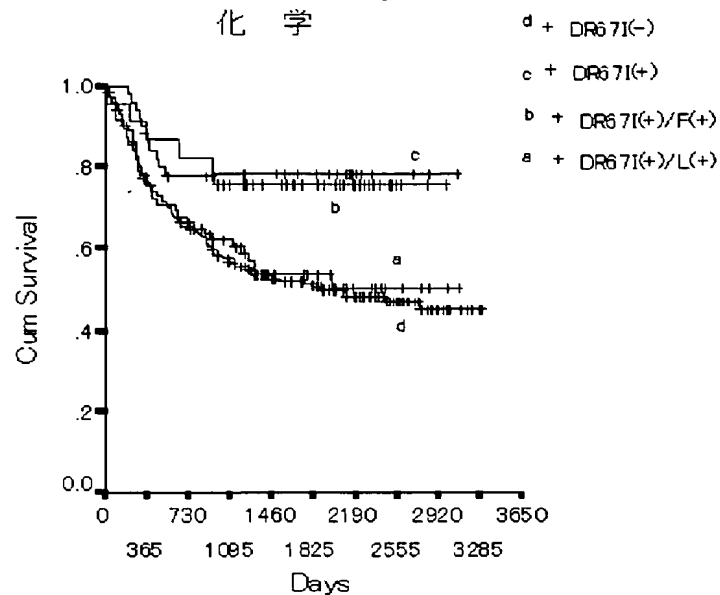
Gastrectomy alone



【図 14】

DR67I,F,L-2

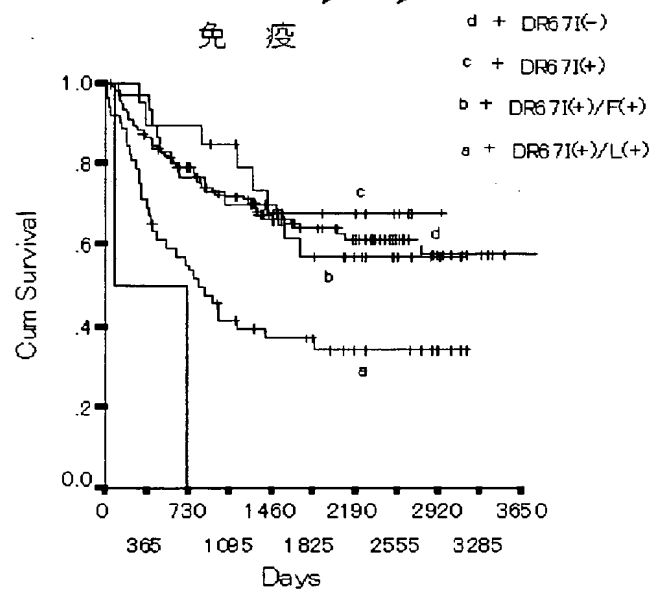
化 学



【図 15】

DR67I,F,L-3

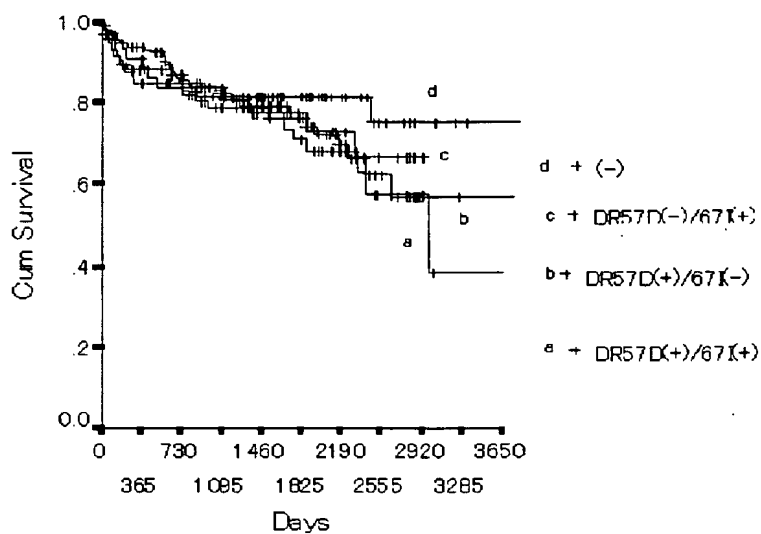
免 疫



【図 16】

DR57D-DR67I-1

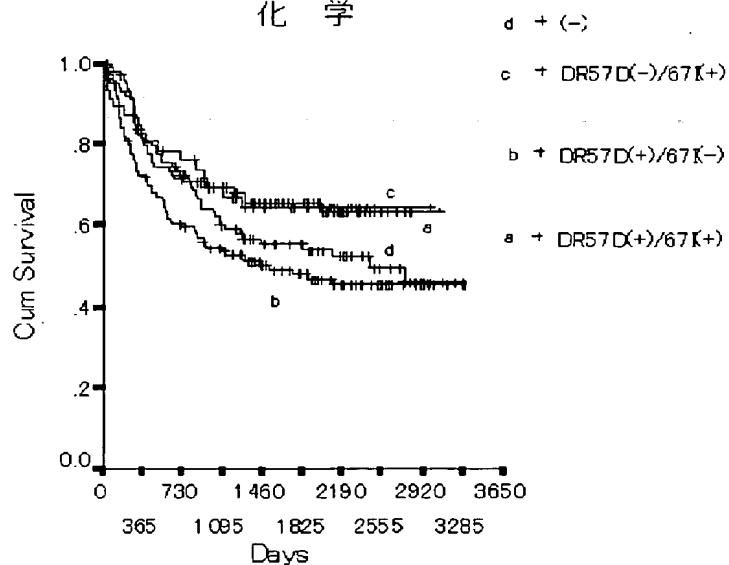
Gastrectomy alone



【図 17】

DR57D-DR67I-2

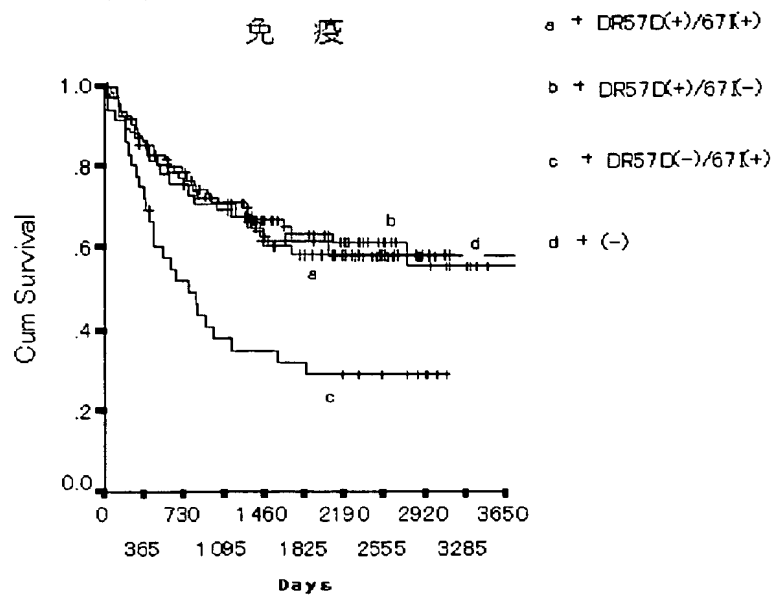
化 学



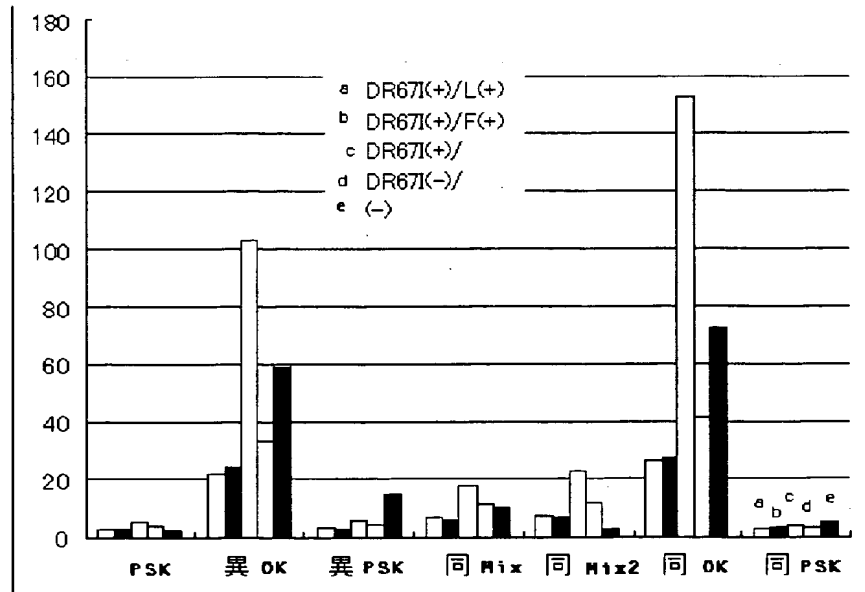
【図 18】

DR57D-DR67I-3

免疫

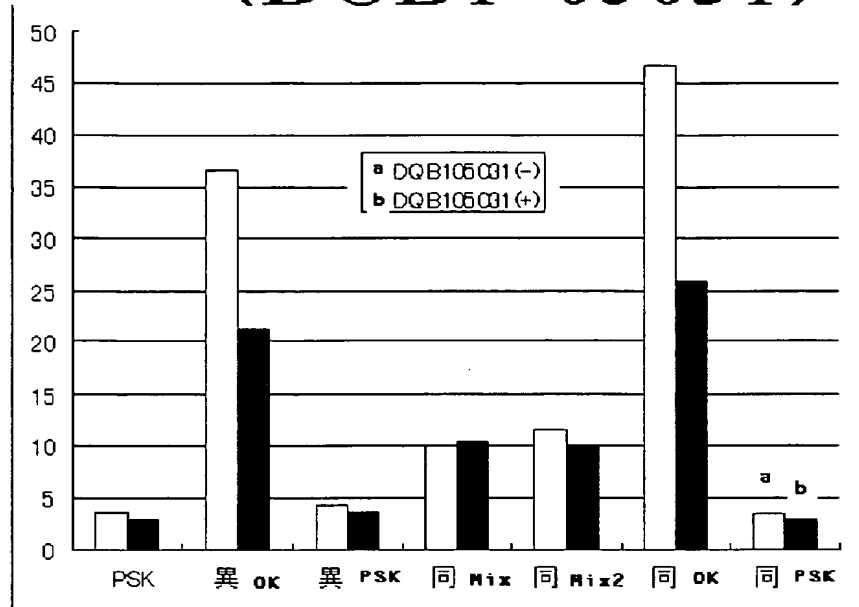


【図 19】

PHA刺激試験7
(DR67I,L,F)

【図 20】

PHA 刺激試験 (DOB1*05031)



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】、HLA遺伝子における特定領域の特定部位のアミノ酸の変異がもたらす機能を解明し、その医療分野における利用手段を提供しようとするもの。

【課題を解決するための手段】 HLA遺伝子におけるコードするアミノ酸をマーカーとする遺伝子検定方法。

- 1) HLAクラスIIのDQB1遺伝子のアミノ酸配列の5 7位及び／又は6 7位
- 2) HLAクラスIIのDRB1遺伝子のアミノ酸配列の5 7位及び／又は6 7位

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2001-111856
受付番号	50100528738
書類名	特許願
担当官	第七担当上席 0096
作成日	平成13年 4月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 4月10日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 1 - 1 1 1 8 5 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 1 4 4 9 3 3]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 4 月 1 0 日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県相模原市上鶴間 4 0 8 - 2 6

氏 名 生越 喬二